



**Department of Medical Biotechnology  
School of Paramedical Sciences  
Qazvin University of Medical Sciences**

# **microRNA**

**Presented by: Razieh Mohammadi\_haji**

**Under supervision of : Dr. Ahmadpour**



# فهرست

- microRNAs
- تاریخچه
- فرآیند های بیولوژیکی انجام شده توسط miRNAs
- سنتز microRNA
- مکانیسم های عملکردی microRNA
- miRNA و سرطان
- تنظیم فعالیت متابولیکی به وسیله miRNAs
- روش های کشف و شناسایی miRNAs
- استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک در شناسایی miRNAs
- منابع



# microRNAs

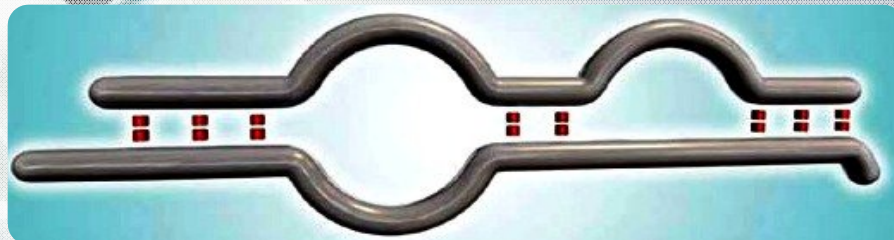
✓ microRNA ها RNA غیر کد کننده کوتاه

✓ با طول تقریبا ۲۲ نوکلئوتید

✓ نقش در تنظیم بیان ژن بعد از ترجمه (تنظیم ۶۰٪ از ژن های انسانی)

✓ دارای نقش مهم در فرآیند های بیولوژی

✓ شناسایی microRNA ۲۵۸۸ در انسان [1]





## تاریخچه

کشف RNA ی  
lin-4 طی مطالعه  
ژن های دخیل در  
نمونه  
Caenorhabditis elegans

Lee و همکاران

1993

ژن lin-4 تنظیم  
کننده ی منفی ژن  
lin-14.


Wightman

طی مطالعات بعدی





• نتیجه ی تحقیقات در دوگروه



• وجود قسمت های مختلفی در بخش 3UTR (ناحیه غیر قابل ترجمه : 3Untranslated region) در mRNA ی ژن lin-14 که از نظر توالی مکمل توالی lin-4 RNA می باشند

## پیگیری آزمون ها توسط Ruvukun و همکاران

اتصال بین این دو مولکول RNA، دلیل اصلی اثر منفی lin-4 RNA بر lin-14 mRNA است و اتصال مذکور موجب کاهش میزان پروتئین LIN-14 و عدم تاثیر بر مقدار lin-14 mRNA میشود.



در سال 2003



Reinhart و همکاران



کشف RNA ی به نام let-7 در نماتود *C. elegans*



دارای نقش مشابه lin-4







# فرآیندهای بیولوژیکی انجام شده توسط miRNAs

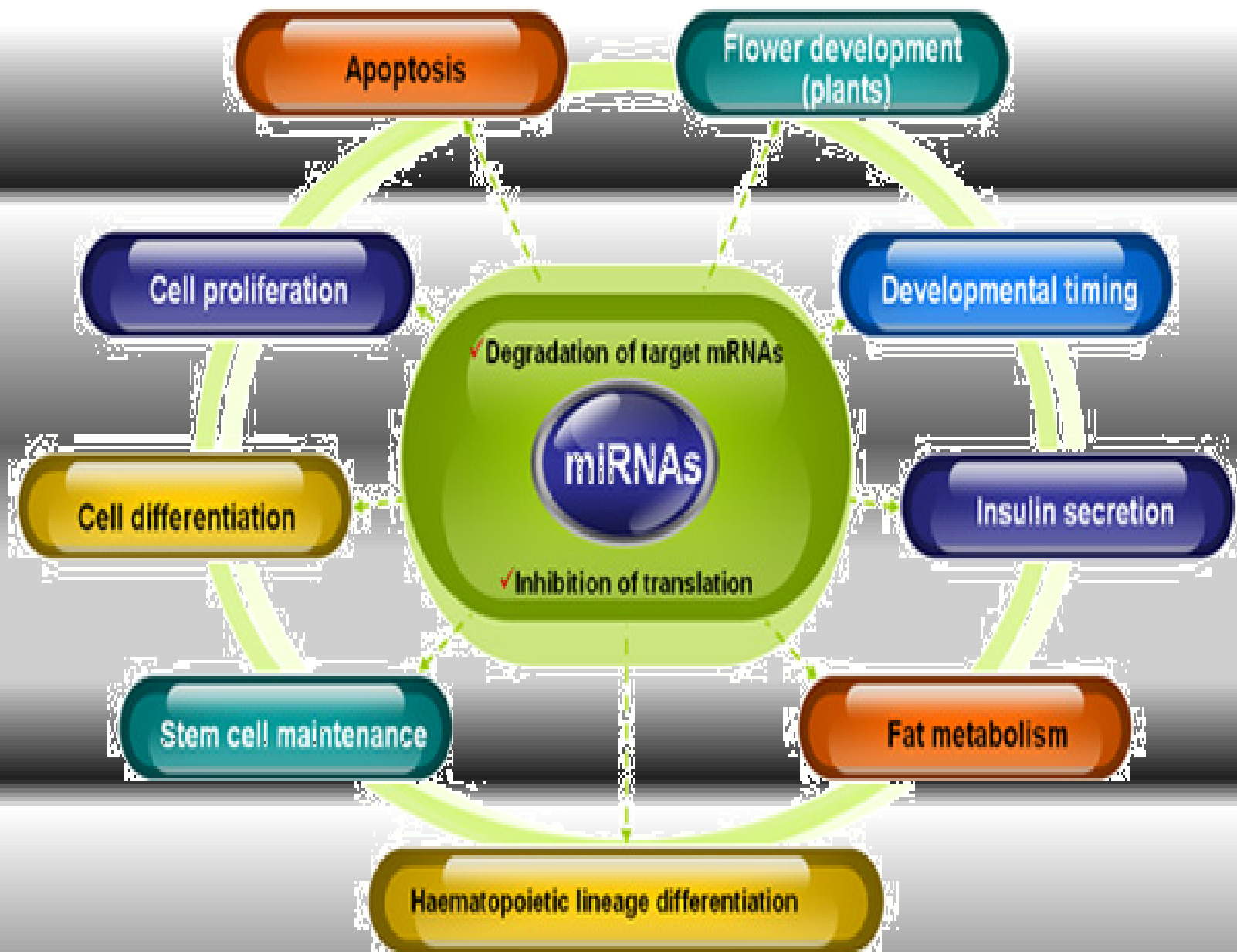
■ موثر روی فرآیندهای مربوط به سرطان شامل: تکثیر، کنترل چرخه ی سلولی، آپوپتوز، تمایز و متابولیسم سلول.

■ تنظیم بیان ژن (از طریق خاموشی ژن، متیلاسیون DNA، رونویسی ژن)

■ دخالت در بیماریهای زیادی مثل فساد سلولهای عصبی، بی نظمی های

متابولیکی و سرطان [4]



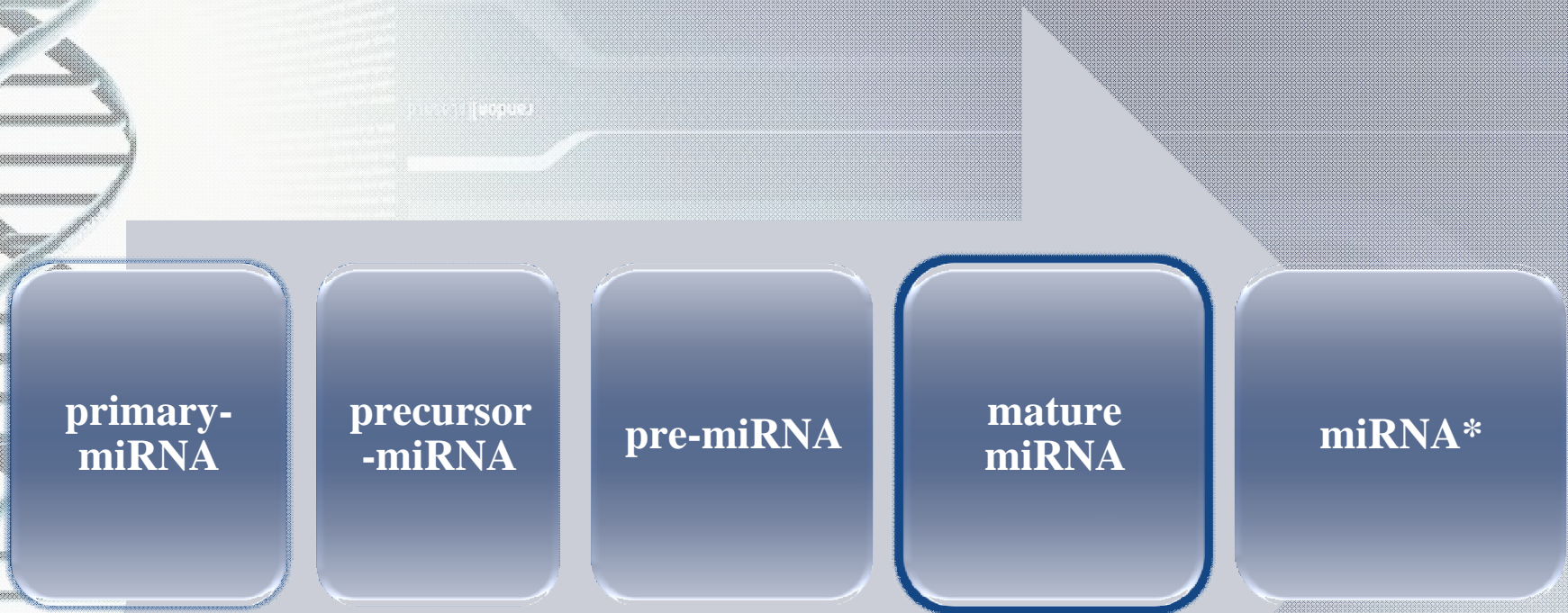


# microRNA و تخریب سلولهای عصبی

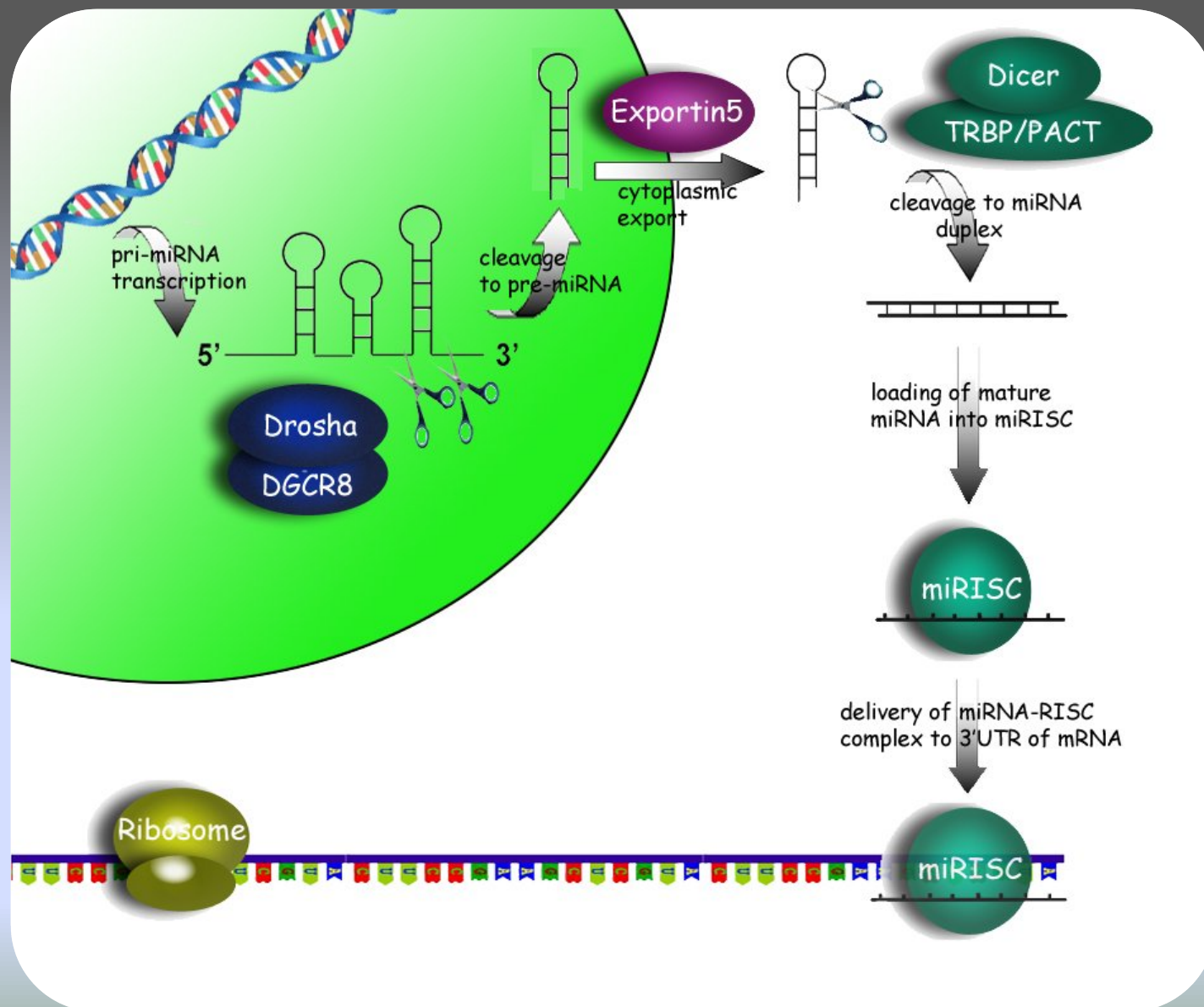




# سنتز microRNA









## مکانیسم های عملکردی microRNA

انتخاب یک رشته از miRNA برای همگذاری و تبدیل به کمپلکس خاموش کننده ی وابسته به RNA (RISC).

اجزای این کمپلکس شامل:

✓ یک miRNA تک رشته ای بالغ

✓ اندونوکلیئاز آرگونوات-1 (AGO-1)



## در نهایت:

❖ اتصال miRNA به آنزیم آرگونوات-۱

❖ اتصال کمپلکس miRNA-RISC از طریق جفت شدن ناکامل بازها بین

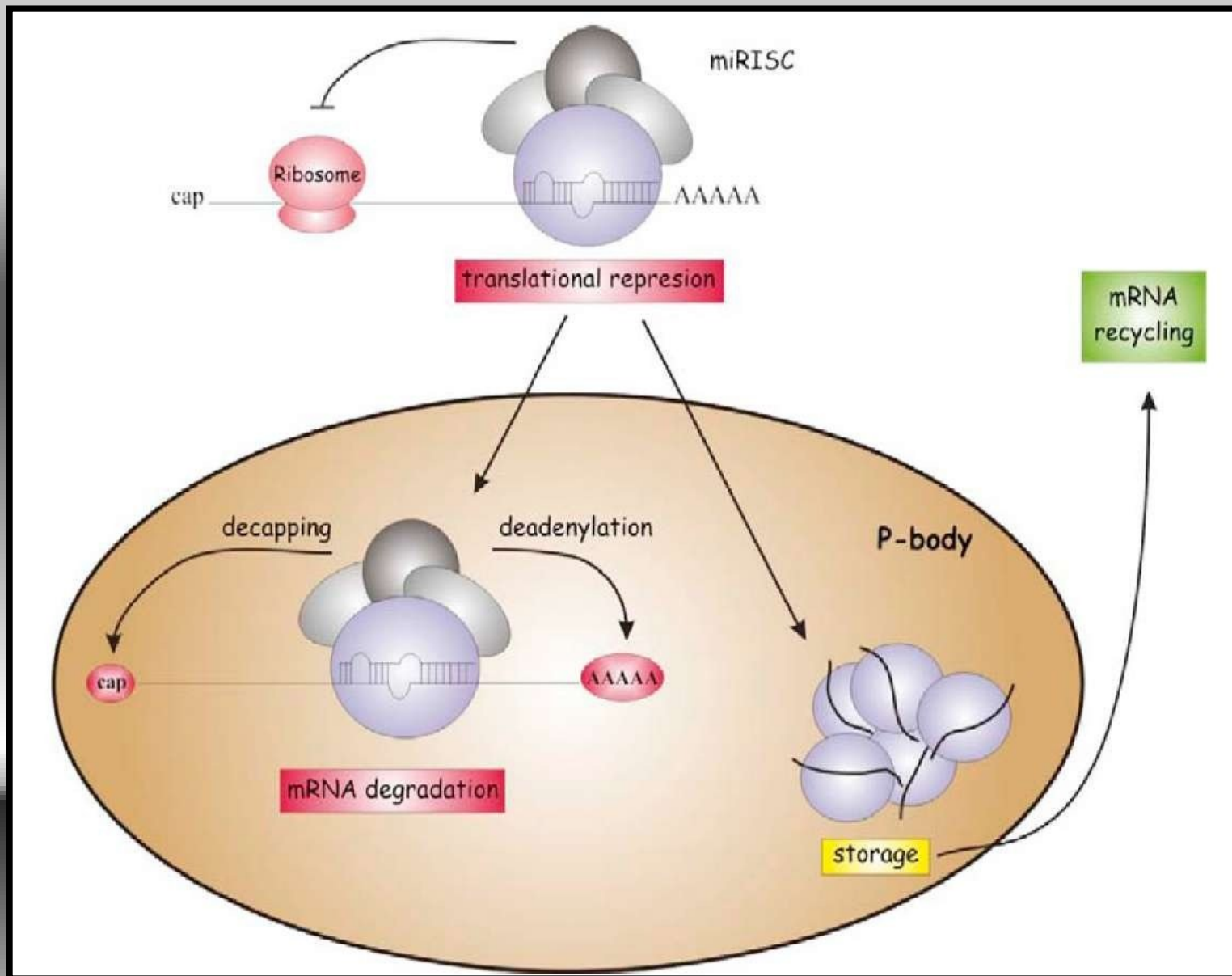
miRNA بالغ متصل به آرگونوات و نواحی مکمل در مناطق ترجمه نشده ی 3

(3-UTRs) در mRNA های هدف

❖ بعد از اتصال بین میرنا و mRNA ی هدف، رخداد اتصال به اجسام P (محل

های تخریب RNA، فاقد ریبوزوم و فاکتورهای ترجمه و در نتیجه اعمال مهار

ترجمه) [6]





The background of the slide features a light blue and white DNA double helix on the left side. A large, solid blue oval is centered on the slide, containing the title text. The overall background has a subtle grid pattern.

# کاربردهای **miRNAs**





1. miRNA و سرطان

2. کنترل چرخه سلولی و تقسیم آن توسط miRNAs

3. تنظیم پیری توسط miRNAs

4. ژن های هدف miRNA و دخیل در تنظیم آسیب به DNA

5. miRNA در تشخیص و درمان سرطان

6. تنظیم فعالیت متابولیکی به وسیله miRNAs



# miRNA و سرطان

✓ سرطان :

نتیجه ی تغییرات ژنتیکی در انکوژن ها و سرکوبگرهای تومور.

✓ microRNA :

انکوژن

دارای 2 نقش

مهارکننده ی تومور



■ میرنا های انکوژنیک شامل :

miR-21,miR-182,miR-10b,miR-106b,miR-20a,miR-183,...

■ میرنا های سرکوبگر تومور شامل :

miR-34a,miR-25,miR-32,miR-107,miR-124,miR-218 ,...[7]



2002

Corce و همکاران

شناسایی اولین ارتباط بین میرنا و سرطان با مطالعه یک ناحیه در کروموزوم 13q14 در بیماران مبتلا به CLL

این ناحیه شامل: دو ژن کد کننده miR-16-microRNA و 1 (miR15-a)، دارای فعالیت ضد توموری.



در سال های اخیر، متمرکز شدن گروه های تحقیقاتی بر روی مطالعه علت  
تغییر بیان miRNA در سرطان [8]

2004

Calin و همکاران

تغییر ناحیه ژنومی نیمی از miRNAs در سرطان



## ارتباط miRNA و سرطان

□ سرکوب و یا افزایش بیان miRNA در سرطان در مقایسه با بافت نرمال

□ تغییر در بیان و یا عملکرد آنزیم های درگیر در بیوژنز miRNA مانند آنزیم

دروشا و دایسر، علت دیگر تغییر بیان miRNA و شکل گیری سرطان .

برای مثال : مشاهده ی کاهش سطح بیان آنزیم های دروشا و دایسر در ۳۹٪ از

بیماران سرطان تخمدان .

# miRNA در تشخیص و درمان سرطان

توسعه ی استراتژی های درمانی مبنی بر:

❑ مهار miRNAs انکوژن (تومورزا)

❑ به کار گیری دوباره ی miRNAs مهار کننده ی تومور

افزایش تحقیقات در زمینه ی استفاده از miRNAs به عنوان بیومارکر های

غیرتهاجمی در پاسخ های درمانی در یک محدوده ی سرطانی شامل:

سرطان شش، روده ی بزرگ، کلیه، گلیوبلاستوما، پروستات و سرطان سینه.



# مهار miRNAs انکوژن

مهار بیان بالای میرنا مرتبط شده با فرآیند های تومورزایی، گزارش شده از چندین مطالعات زئوگرافت که پوشش داده انواع فرم های سرطانی مختلف .

❖ استفاده از تزریق های وریدی کونژوگه با کلسترول برای درمان سرطان کبدی  
❖ استفاده از درمان سیستمیک با مهارکننده های miRNA در یک محیط سرطانی  
❖ شناسایی مهارگرهایی بر پایه ی نوکلئیک اسیدهای پتیدی و محصور در ذرات نانویی

❖ با ایجاد برش توسط میرناهای مصنوعی جفت شونده با mRNA  
❖ کم کردن بیان میرناهای انکوژن توسط عوامل اپی ژنتیکی مثل متیلاسیون پروموتری

❖ استفاده از الیگونوکلوئوتید های آنتی سنس جفت شونده با میرنا به منظور کاهش بیان آن... (برای مثال: Antagomir)

❖ استفاده از الیگونوکلوئوتید های آنتی سنس LNA (نوکلئوتیدهای قفل شده)



✓ **miR-122** ویژه ی کبد : نقش آن در کنترل سطوح کلسترول پلاسما و تسهیل تکثیر ویروس هپاتیت C.

Kauppinen و همکاران



استفاده از نوکلئیک اسید قفل شده (LNA) بر علیه **miR-122** در دو نوع موش و پستانداران



مهار **miR-122** ویژه ی کبد

Kruztfeldt و همکاران



استفاده از تزریق های وریدی کونژوگه با کلسترول و تثبیت شده به وسیله ی متیلاسیون 2OH



مهار **miR-122** ویژه ی کبد

مهار سرکوب mRNA

کاهش سطوح کلسترول پلاسما در توافق با فعالیت mRNA هدف



## **miR-9:**

افزایش بیان در سرطان Hodgkin lymphoma

### **مکانیسم مهاری آن:**

استفاده از درمان سیستمیک با استفاده از یک مهارگر مشتق شده LNA در یک موش مدل زئوگرافت

### **نتیجه:**

❖ کاهش رشد سرطان در کبد

❖ افزایش بیان mRNA (مورد هدف miR-9).



# به کارگیری دوباره ی miRNAs مهار کننده ی تومور

به کارگیری مجدد miRNAs با فعالیت مهار کنندگی تومور، پیچیده شدن این مسئله به خاطر تجزیه ی سریع RNA در بافت و سرم.

از این رو توجه شده به روش های :

- تحویل ویروسی

- میرناهای شبیه سازی شده.



## **miR-143-145** ❖

کاهش بیان در سرطان پانکراس


**اعمال مجدد آن از طریق:**

اجرای سیستماتیک یک وکتور بیانی miR-143-145 فرموله شده با لیپوزوم

**نتیجه:**

کاهش رشد در زئوگرافت های سرطان پانکراس





**miR-26a ✓**

- به عنوان مهارگر کلیدی سایکلین D2,E2
- کاهش بیان در سرطان سلولهای کبدی

**اعمال مجدد آن ها از طریق:**

تحويل سیستمیک بیان شده از یک وکتور ویروسی

**نتیجه:**

مهار تکثیر سلول سرطانی

القای آپوپتوز



ظهور میرناها به عنوان یک خانواده ی مهم با چشم انداز امید بخش در درمان سرطان.

انجام بررسی با دقت داروهای مشتق شده از میرنا، نسبت به طبقه های دارویی دیگر .

دستکاری سطح بیانی آنها ← ایجاد اثرات پلیوتروپیک

## بیان بالای miR-26a :

■ باعث افزایش پتانسیل متاستازی سلول های سرطان شش

■ پیشرفت توسعه ی لوسمی لمفوبلاستیک سلول T





## تنظیم کلیدی miRNA در مسیرهای مرتبط با سرطان

1. کنترل چرخه سلولی و تقسیم آن
2. تنظیم پیری
3. ژن های هدف miRNA و دخیل در تنظیم آسیب به DNA



# کنترل چرخه سلولی و تقسیم آن توسط miRNAs

ثابت شدن نقش میرنا در کنترل تکثیر سلولی و وجود مدارکی مبنی بر مشارکت آنها در ایجاد سرطان به وسیله ایجاد اختلال در مسیرهای تنظیمی مهم چرخه سلولی.

miRNAs انکوژنیک:

✓ بیان بالا در سرطان

✓ فعالیت به منظور تسهیل در ورود و پیشرفت چرخه سلولی

miRNAs سرکوبگر تومور:

✓ فقدان آنها در سلولهای سرطانی

✓ کمک به القای توقف چرخه سلولی





## موارد مورد هدف miRNAs :

❖ مهار بیان تنظیم کننده های مثبت چرخه سلولی شامل:

CDK1,CDK2 و CDK6 علاوه بر سایکلین D1,D3 و E1 که مورد هدف

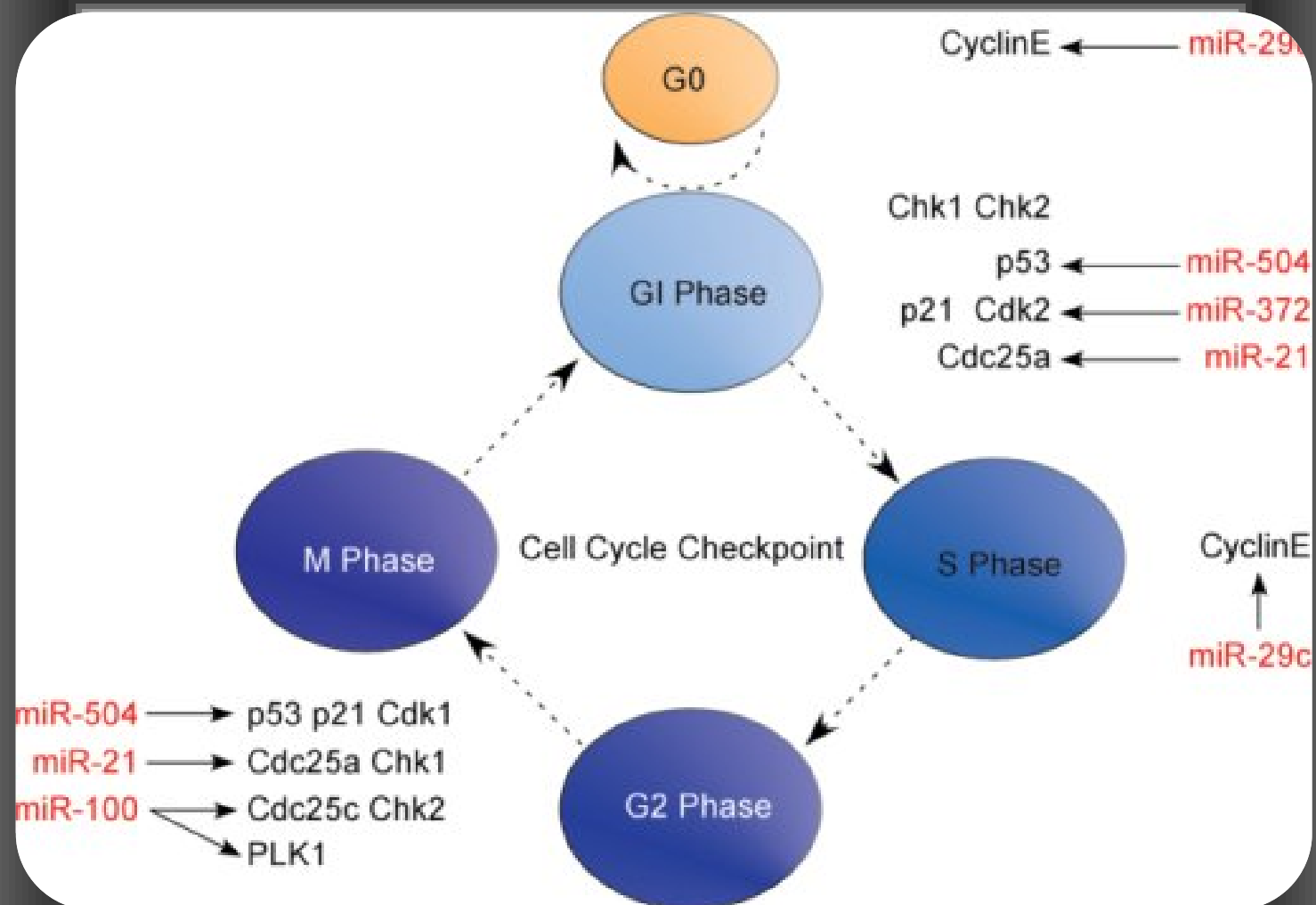
miRNAs بوده و ایجاد توقف چرخه سلولی در مرحله G1 و ممانعت از ایجاد

سرطان

❖ مهار بیان تنظیم کننده های منفی چرخه سلولی شامل:

pRb ، اعضای خانواده P107 و P130 توسط miRNAs و ایجاد سرطان.







# تنظیم پیری توسط miRNAs

مفهوم پیری:

- خروج غیر قابل برگشت از چرخه سلولی
  - مانع تومورزایی
- شامل ۲ زیرگروه:

**1.** پیری ناشی از استرس ، فشار (به عنوان نتیجه فشار اکسیداتیو و سیگنال آسیب به DNA) و همانندسازی (رسیدن سلول ها به سن بحرانی در نتیجه کوتاه شدن تلومر)

**2.** پیری نارس و نابهنگام (پیش از بلوغ)



## نقش میرنا در القای پیری:

□ تنظیم مسیرهای مربوط به پیری

□ داشتن نقش تنظیمی منفی تعداد زیادی از miRNAs در پیشبرد چرخه

سلولی و القای پیری.





مثال مربوط به تنظیم مثبت پیری توسط miRNA:

❖ هدف قرار گرفتن HMGA2 (مهارکننده ی القاگرهای کلیدی پیری  
P16 و P19) توسط Let-7.

مثال مربوط به تنظیم منفی پیری توسط miRNA:

❖ سرکوب P16 (مهارکننده ی ویژه CDK4/6) توسط miR-24.



**HMGA2**



A light blue rectangular box labeled 'HMGA2' is positioned on the left. A blue-outlined oval labeled 'Let-7' overlaps the top-right corner of the box.

**Let-7**

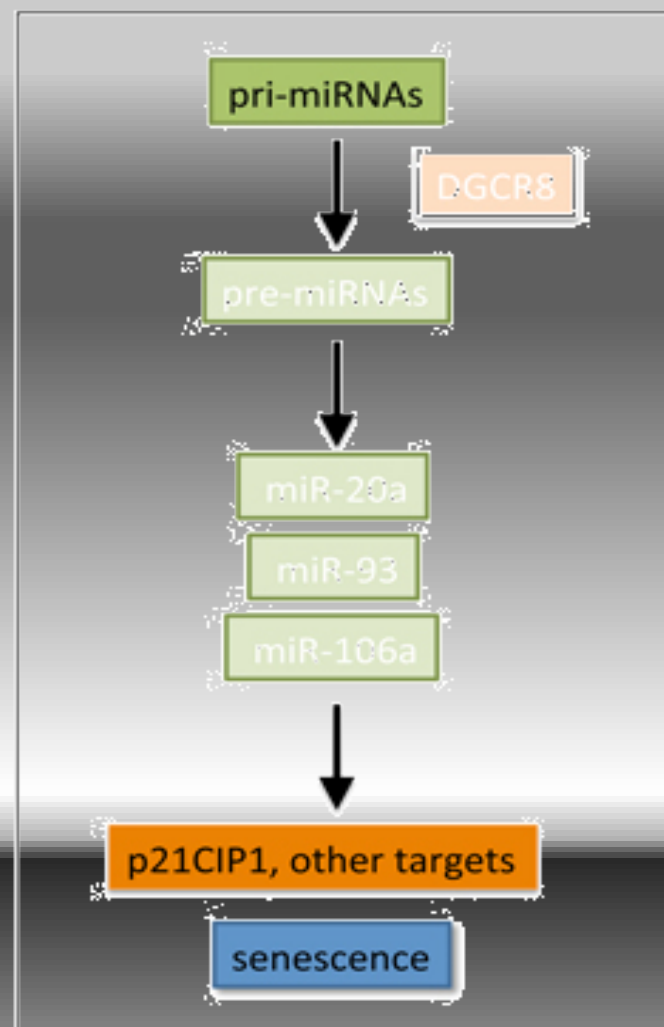
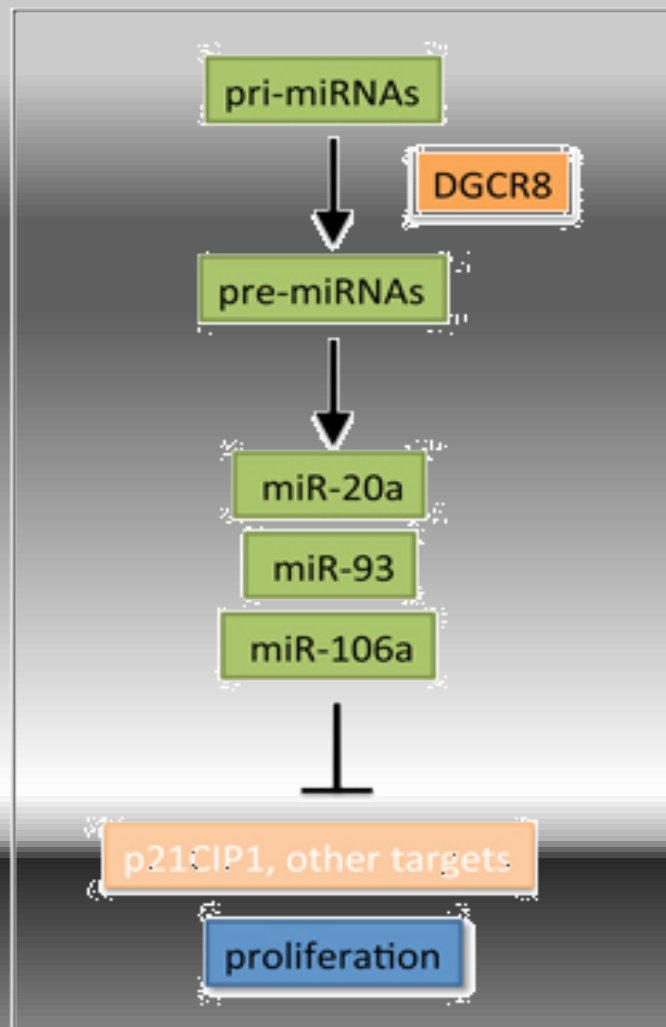
**P16**



A light blue rectangular box labeled 'P16' is positioned on the right. A blue-outlined oval labeled 'miR-24' overlaps the top-right corner of the box.

**miR-24**







# ژن های هدف miRNA و دخیل در تنظیم آسیب به DNA

تنظیم ژنهای مهم به وسیله miRNAs ویژه در طی پاسخ به آسیب DNA. برای مثال:

miR-421 (افزایش بیان این گروه در نوروبلاستوما) ← هدف قرار دادن کیناز اولیه ی حسگر آسیب یعنی ATM (فسفریله کردن یک تعداد زیادی از ژن های هدف با نقش کلیدی در پاسخ به شکستگی های دو رشته DNA).

miR-24 ← هدف قرار دادن E2F1 و CDK 4/6، اثر منفی بر چرخه سلولی و شکل گیری اثرات ضد توموری آن.



## نقش P53 در پاسخ به آسیب DNA:

- ❑ تنظیم گر اصلی در پاسخ به استرس سلولی
- ❑ فعالیت به عنوان فاکتور رونویسی و تنظیم بیان ژن های چندگانه
- ❑ توقف چرخه سلولی
- ❑ القای آپوپتوز
- ❑ تنظیم بیورژنز برخی از miRNAs



## miRNAs تنظیم کننده ی منفی P53: ارتباط با انتهای 3. P53.





## miRNAs تنظیم کننده ی مثبت P53:

**miR-29**



**هدف قرار دادن CDC42 (تنظیم گر منفی P53)**

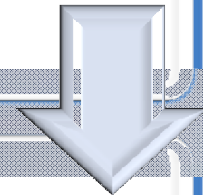


**اثر مثبت بر آپوپتوز انجام شده توسط P53**

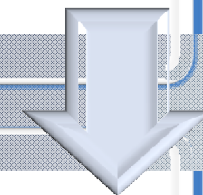




**miR-17-92 , miR-20a ,miR-125b**

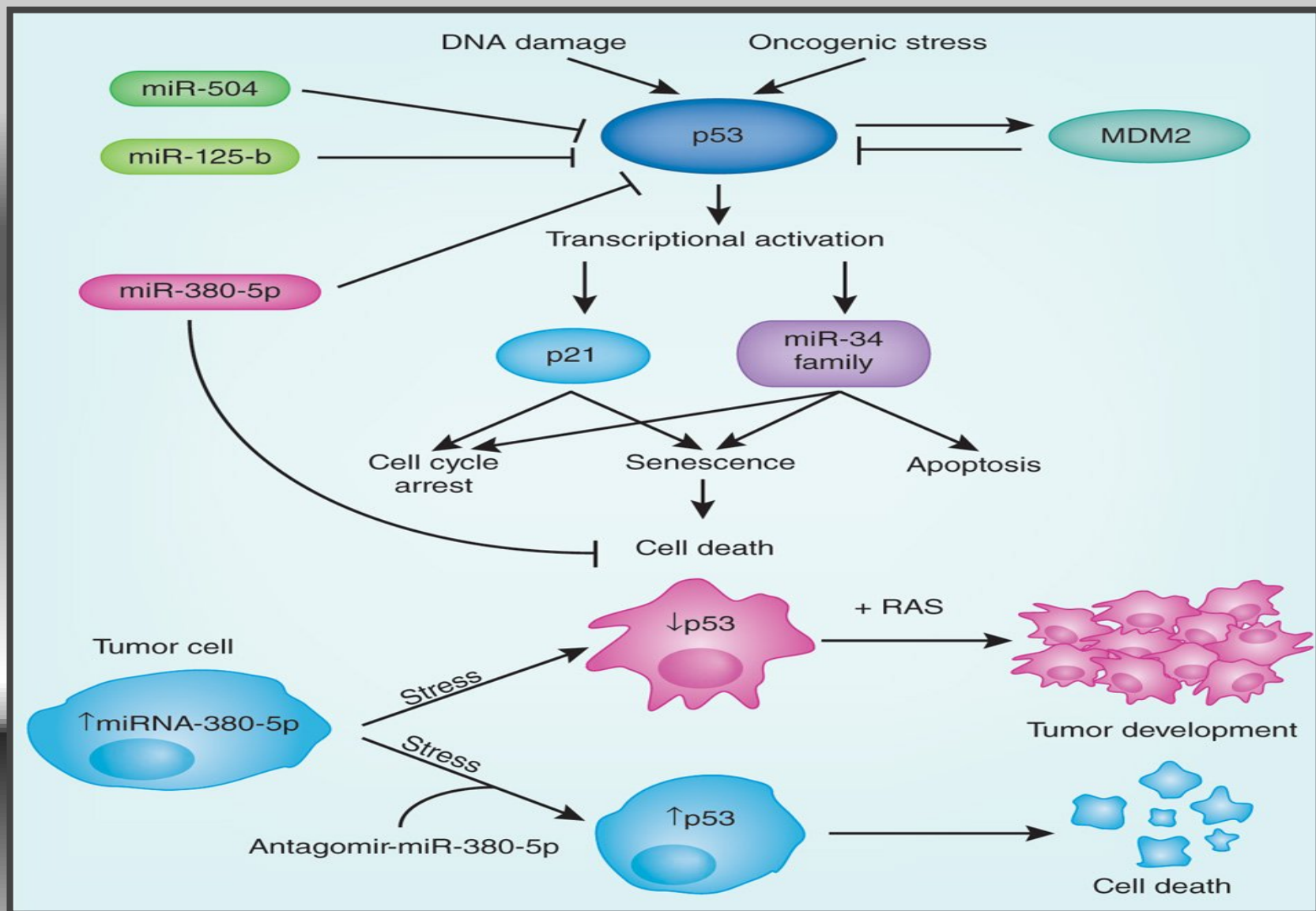


**هدف قرار دادن فاکتور رونویسی E2F**



**دارای فعالیت سرکوبگر تومور**







## تنظیم فعالیت متابولیکی به وسیله miRNAs

✓ تنظیم میزان گلوکز ورودی از طریق تغییر بیان GLUTs توسط


miRNA.

✓ تاثیر چندین miRNA بر روی رونویسی ژن و بیان انتقال دهنده

های گلوکز (GLUTs) (مسئول انتقال گلوکز به داخل سیتوپلاسم)



## در متابولیسم گلوکز:

● miR-133 [24] or miR-195-5p  GLUT3 or GLUT4

● miR-143  hexokinase 2(HK2)

● miR-15a/16-1  aldolase A(Aldo A) [10]



# روش های کشف و شناسایی miRNAs

✓ متدهای سنتی شامل:

Northern blotting, RT-PCR, microarrays ....

✓ متدهای جدید و توسعه یافته شامل:

Nanoparticle-derived probes, isothermal amplification, electrochemical methods....[11]



# روش های جدید و توسعه یافته جهت شناسایی miRNA

1. شناسایی miRNA بر پایه روش های تکثیری غیر از PCR (PCR.free) شامل:

■ روش تکثیری هم دما (isothermal)

■ روش تکثیری بر پایه Rolling cycle

2. شناسایی miRNA بر پایه مواد نانویی یا نانوتکنولوژی در ترکیب با روش های شناسایی دیگر



## روش های تکثیری هم دما

مورد استفاده برای تکثیر الیگونوکلوئوتیدها با استفاده از فعالیت پلیمرازی و آنزیم ایجاد کننده شکاف.

مزیت های این تکنیک شامل:

✓ انجام عمل گسترش توالی با جایگاه ویژه و ایجاد برش

✓ ایجاد و آزادسازی محصول تکثیر یافته مورد نظر

✓ یک روند تکثیری با سرعت بالا

✓ دارای راندمان تکثیر بهتری نسبت به PCR

✓ عدم نیاز به ابزار تخصصی ویژه

✓ اجرای عملیات در یک دمای ثابت

✓ یک روش خوب و مناسب برای تکثیر miRNA



## روش تکثیری بر پایه Rolling cycle (RCA) :

❖ از واکنش های تکثیری هم دما

❖ مورد استفاده برای تکثیر RNA و DNA

❖ روش تکثیری مناسب برای میرنا





معایب تکثیر اهم دما و سیستم RCA :

■ ملزم تنظیمات توالی پروب

■ شامل چندین پرایمر و الگو (طراحی ماهرانه هر جزئی)

■ پیچیده بودن این سیستم ها

■ احتمال خطر واکنش های جانبی



# شناسایی miRNA بر پایه مواد نانویی یا نانتکنولوژی در ترکیب با روش های شناسایی دیگر

نانتکنولوژی و مواد نانویی:

✓ ابزاری قوی در آنالیزو شناسایی اهداف زیستی

✓ دارای حساسیت و راندمان بالا (به ویژه در ترکیب با مواد دیگر مثل روش های الکتریکالی، microarray و ...)

مواد نانویی به کار گرفته شده در شناسایی miRNA شامل:

نانوذرات طلا، ذرات مغناطیسی، نقاط کوانتوم، اکسید گرافن و ... [10]



# استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک در شناسایی miRNAs

❑ شناسایی عملکرد زیستی miRNAs

❑ آنالیز میرنا با استفاده از پایگاه های داده بر مبنای وب سایت های نام برده شده

❑ جستجو بر پایه ی نام میرنا و یا توالی آن

✓ وب سایت آنالیز کننده ی عمومی ncRNAs و آنالیزکننده ی ویژه ی miRNA



**NRDR(Non-coding RNA Databases Resource)**

**<http://www.ncrnadatabases.org>**



[Home](#)
[About](#)
[Search](#)
[Browser](#)
[Statistics](#)
[Team](#)

## SEARCH

Database name:



Overview (Description):



RNA Families:





Information Content:



Information Source:



☒ Experimental ☐ In silico annotation ☐ Literature ☐ Manual Curation ☒ Prediction 



Organism:



Source:



Database has the following Search Method(s):

☐ Genomic Location ☒ Keyword ☐ Density of ncRNAs ☒ Similarity ☒ TAG ☐ Tabular 

Database allows:



Download

☐ Multiple Search

☐ Graphic View 



Search

Clear





این وب سایت شامل چندین پایگاه اطلاعاتی است،مهمترین آنها شامل:

➤ **miRBase,dbDEMC ,TarBase & RFAM .[12]**

<http://159.226.118.44/dbDEMC/index.html>

<http://www.mirbase.org>

<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>

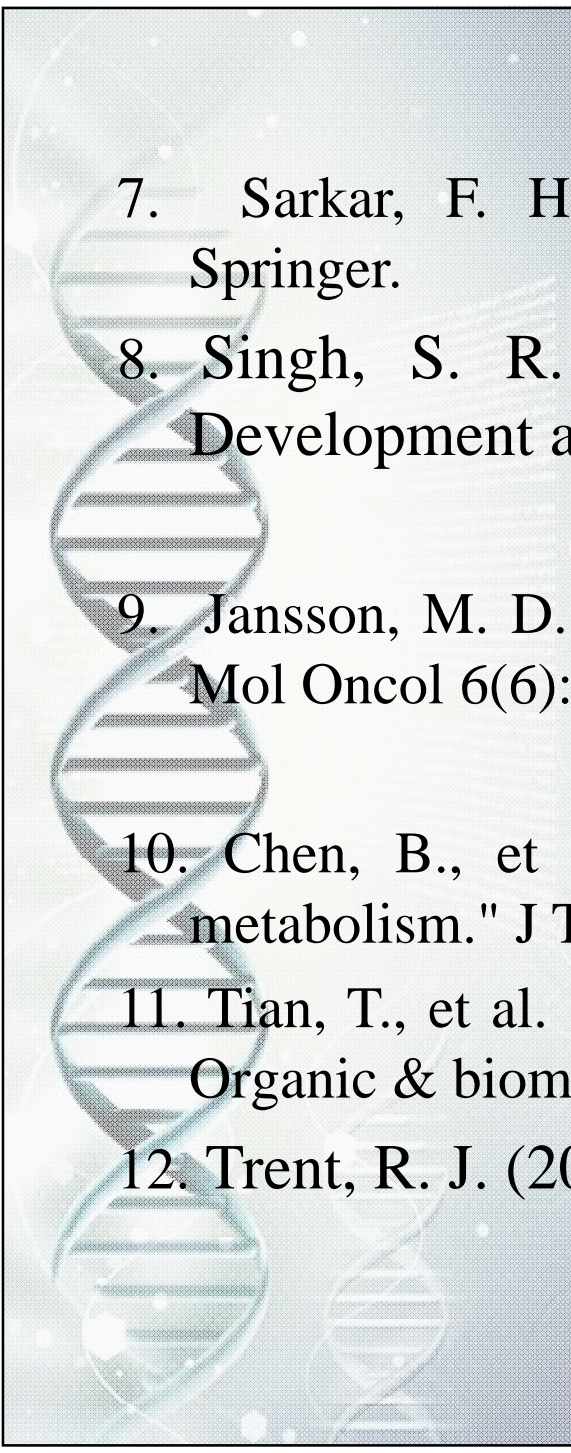
<http://rfam.sanger.ac.uk>



## منابع

1. Singh, S. R. and P. Rameshwar (2014). MicroRNA in Development and in the Progression of Cancer, Springer.
2. Acunzo, M., et al. (2015). "MicroRNA and cancer–A brief overview." Advances in biological regulation 57: 1-9.
3. Singh, S. R. and P. Rameshwar (2014). MicroRNA in Development and in the Progression of Cancer, Springer.
4. Jansson, M. D. and A. H. Lund (2012). "MicroRNA and cancer." Mol Oncol 6(6): 590-610.
5. Kwak, P. B., et al. (2010). "The microRNA pathway and cancer." Cancer science 101(11): 2309-2315.
6. Singh, S. R. and P. Rameshwar (2014). MicroRNA in Development and in the Progression of Cancer, Springer.



- 
7. Sarkar, F. H. (2014). MicroRNA Targeted Cancer Therapy, Springer.
  8. Singh, S. R. and P. Rameshwar (2014). MicroRNA in Development and in the Progression of Cancer, Springer.
  9. Jansson, M. D. and A. H. Lund (2012). "MicroRNA and cancer." Mol Oncol 6(6): 590-610.
  10. Chen, B., et al. (2012). "Roles of microRNA on cancer cell metabolism." J Transl Med 10(1): 228.
  11. Tian, T., et al. (2015). "A review: microRNA detection methods." Organic & biomolecular chemistry.
  12. Trent, R. J. (2008). Clinical bioinformatics, Springer.





Thanks for your attention